

REC'D 15 NOV 2000

10/088232  
PCT/JP00/06401

WIPO PCT

日本国特許庁

20.09.00

PATENT OFFICE  
JAPANESE GOVERNMENT

JP00/6401

別紙添付の書類に記載されている事項は下記の出願書類に記載されている事項と同一であることを証明する。

This is to certify that the annexed is a true copy of the following application as filed with this Office.

出願年月日

Date of Application:

1999年 9月20日

出願番号

Application Number:

平成11年特許願第264844号

出願人

Applicant(s):

富士写真フイルム株式会社

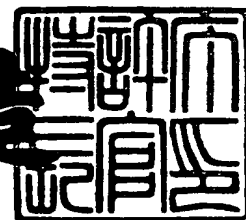
PRIORITY  
DOCUMENT

SUBMITTED OR TRANSMITTED IN  
COMPLIANCE WITH RULE 17.1(a) OR (b)

2000年10月27日

特許庁長官  
Commissioner,  
Patent Office

及川耕造



出証番号 出証特2000-3087548

【書類名】 特許願

【整理番号】 99318M

【提出日】 平成11年 9月20日

【あて先】 特許庁長官 殿

【国際特許分類】 C07D209/00

【発明者】

【住所又は居所】 神奈川県南足柄市中沼 2 1 0 番地 富士写真フイルム株式会社足柄研究所内

【氏名】 中村 剛希

【発明者】

【住所又は居所】 神奈川県南足柄市中沼 2 1 0 番地 富士写真フイルム株式会社足柄研究所内

【氏名】 西垣 純爾

【特許出願人】

【識別番号】 000005201

【氏名又は名称】 富士写真フイルム株式会社

【代理人】

【識別番号】 100096219

【弁理士】

【氏名又は名称】 今村 正純

【選任した代理人】

【識別番号】 100092635

【弁理士】

【氏名又は名称】 塩澤 寿夫

【選任した代理人】

【識別番号】 100095843

【弁理士】

【氏名又は名称】 釜田 淳爾

【手数料の表示】

【予納台帳番号】 038357

【納付金額】 21,000円

【提出物件の目録】

【物件名】 明細書 1

【物件名】 要約書 1

【包括委任状番号】 9800464

【プルーフの要否】 要

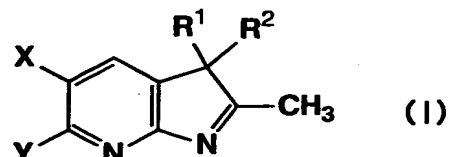
【書類名】 明細書

【発明の名称】 ハロゲン置換 7-アザインドレニン誘導体

【特許請求の範囲】

【請求項 1】 下記一般式 (I) :

【化 1】



(式中、X及びYはそれぞれ独立に水素原子又はハロゲン原子を示すが、いずれか一方はハロゲン原子を示し； $R^1$ 及び $R^2$ はそれぞれ独立に置換又は無置換のアルキル基を示すか、あるいは $R^1$ 及び $R^2$ が互いに結合してそれらが置換する炭素原子とともに3～7員環の非芳香族炭素環又は非芳香族ヘテロ環を形成してもよい)で表される3H-ピロロ[2, 3-b]ピリジン化合物又はその塩。

【請求項 2】  $R^1$ 及び $R^2$ がメチル基である請求項 1に記載の3H-ピロロ[2, 3-b]ピリジン化合物又はその塩。

【発明の詳細な説明】

【0001】

【発明の属する技術分野】

本発明は蛍光色素の中間体として有用な化合物に関する。

【0002】

【従来の技術】

蛍光色素は古くから知られている色素であるが、近年の生化学や遺伝子診断の分野においては標識用マーカーとして利用され、蛍光標識技術として極めて重要な位置を占めるに至っている。この用途に用いられる蛍光色素としては、フルオレセイン色素誘導体、ローダミン色素誘導体などがよく知られており、この他に、アマシャム社製のシアニン色素Cy 3やCy 5が標識用蛍光色素として汎用されている。もっとも、これらの色素は励起波長がCy 3とCy 5の2種類の波長に限定されているため、さらに幅広い励起波長への対応が用途拡大の上で望まれている。また、さらなる蛍光強度の向上も標識の感度向上の点からも強く望まれて

いる。

【0003】

一方、ジャーナル・オブ・ケミカル・ソサエティ（JCS）、1959年、3202頁に3H-ピロロ[2,3-b]ピリジン化合物から誘導されるアザシアニン色素が強い蛍光を示すことが報告されている。しかしながら、この色素の誘導体に関しては従来あまり知られておらず、現状では、種々の励起波長に対応できる誘導体が提供されているとは言い難い。

【0004】

様々な励起波長への対応という目的では、色素の合成中間体である3H-ピロロ[2,3-b]ピリジン化合物が重要であり、特にハロゲン置換の3H-ピロロ[2,3-b]ピリジン化合物はハロゲン原子を他の求核基による求核置換反応やホウ素酸（ボロニックアシッド）とのカップリング反応によって種々の誘導体へと誘導できるため、極めて重要であると考えられる。しかし、このような化合物はこれまで知られていなかった。

【0005】

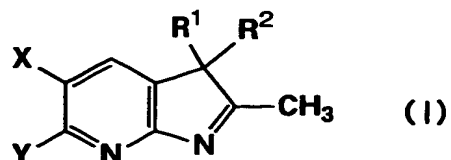
【発明が解決しようとする課題及び課題を解決するための手段】

本発明の課題は、蛍光強度が高く、かつ様々な励起波長に対応することが可能なアザシアニン色素の合成を可能にする色素合成中間体を提供することにある。本発明者らは上記の課題を解決すべく鋭意研究を行い、下記の一般式（I）で表される化合物を提供することに成功し、本発明を完成するに至った。

【0006】

すなわち、本発明は、下記一般式（I）：

【化2】



（式中、X及びYはそれぞれ独立に水素原子又はハロゲン原子を示すが、いずれか一方はハロゲン原子を示し；R<sup>1</sup>及びR<sup>2</sup>はそれぞれ独立に置換又は無置換のアルキル基を示すか、あるいはR<sup>1</sup>及びR<sup>2</sup>が互いに結合してそれらが置換する炭素

原子とともに 3～7 員環の非芳香族炭素環又は非芳香族ヘテロ環を形成してもよい) で表される 3 H-ピロロ [2, 3-b] ピリジン化合物又はその塩を提供するものである。上記一般式 (I) において  $R^1$  及び  $R^2$  がメチル基である 3 H-ピロロ [2, 3-b] ピリジン化合物又はその塩が好ましい態様として提供される。

## 【0007】

## 【発明の実施の形態】

X 及び Y はそれぞれ独立に水素原子又はハロゲン原子を表すが、それらのうち少なくとも一方はハロゲン原子を示す。ハロゲン原子としては、フッ素原子、塩素原子、臭素原子、又はヨウ素のいずれを用いてもよい (本明細書においてハロゲン原子という場合にも同様である)。フッ素原子又は塩素原子はそのまま蛍光色素として用いる場合に好ましく、臭素原子又はヨウ素原子はそのまま色素にしても用いることができるが、他の官能基への変換が容易な点で合成的な意味で好ましい。

## 【0008】

$R^1$  及び  $R^2$  が示すアルキル基は、炭素数 10 以下のアルキル基が好ましく、直鎖状、分枝鎖状、環状、又はそれらの組み合わせのいずれでもよい (本明細書において言及するアルキル部分を含む他の置換基のアルキル部分についても同様である)。  $R^1$  及び  $R^2$  が示すアルキル基は 1 又は 2 個以上の置換基を有していてもよく、2 個以上の置換基を有する場合には、それらは同一でも異なってもよい。

## 【0009】

$R^1$  及び  $R^2$  が示すアルキル基上の置換基は特に限定されないが、例えば、ハロゲン原子、カルボキシ基、スルホ基、ヒドロキシ基、アルコキシ基、アリーロキシ基 (アリール基としては 6～10 員環のアリール基、例えばフェニル基、ナフチル基などを用いることができる。アリール部分を含む他の置換基についても同様である)、カルボアミド基、スルホンアミド基、カルバモイル基、スルファモイル基、アルキルチオ基、アリールチオ基、アルコキシカルボニル基、アルキルカルボニルオキシ基、又はアリールカルボニルオキシ基が好ましく、ヒドロキ

シ基、アルコキシ基、カルボアミド基、スルホンアミド基、又はカルボキシル基がさらに好ましく、最も好ましくはヒドロキシル基又はアルコキシ基である。R<sup>1</sup>およびR<sup>2</sup>はとして、炭素数 1～5 の置換又は無置換のアルキル基が好ましく、さらに好ましくは炭素数 1～3 の無置換アルキル基であり、最も好ましくはメチル基である。

## 【0010】

R<sup>1</sup>及びR<sup>2</sup>は互いに結合してそれらが置換する炭素原子とともに 3～7 員の非芳香族炭素環又は非芳香族ヘテロ環を形成してもよい。環の構成原子として含まれるヘテロ原子の種類及び個数は特に限定されないが、例えば、窒素原子、酸素原子、又は硫黄原子を 1～3 個程度、好ましくは 1 個のヘテロ原子を含むことができる。2 個以上のヘテロ原子を含む場合にはそれらは同一でも異なってもよい。形成される環には二重結合が 1 個又は 2 個以上含まれていてもよい。形成される環の例としては、例えば、シクロプロパン環、シクロブタン環、シクロペンタン環、シクロペンテン環、シクロヘキサン環、シクロヘキセン環、シクロヘプタン環、シクロヘプテン環、テトラヒドロフラン環、テトラヒドロピラン環が好ましく、シクロペンタン環、シクロペンテン環、又はシクロヘキサン環がより好ましい。これらの環の環上は 1 又は 2 個以上の置換基が存在していてもよい。置換基としては炭素数 1～5 程度のアルキル基のほか、上記 R<sup>1</sup>及びR<sup>2</sup>が示すアルキル基について説明した置換基などを挙げることができる。

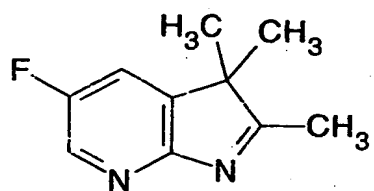
## 【0011】

一般式 (I) で表される化合物の具体例を示すが、本発明の範囲はこれらの具体例に限定されることはない。

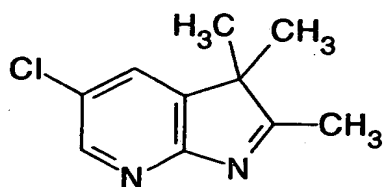
## 【0012】

【化 3】

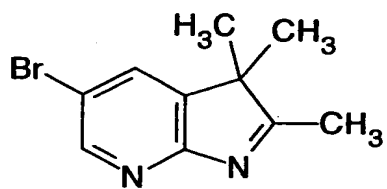
A I N - 1



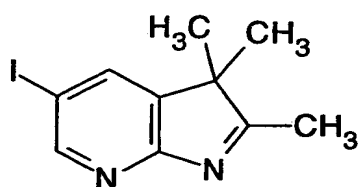
A I N - 2



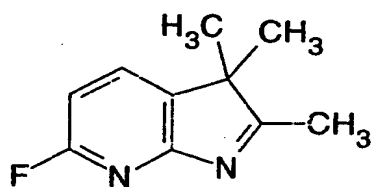
A I N - 3



A I N - 4



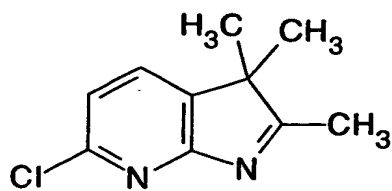
A I N - 5



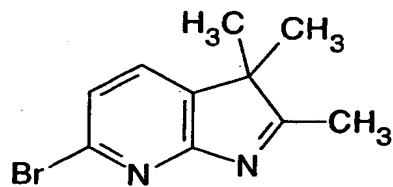
【 0 0 1 3 】

【化 4】

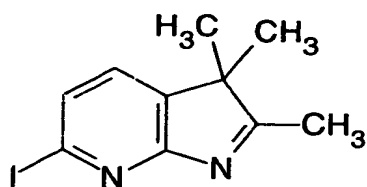
A I N-6



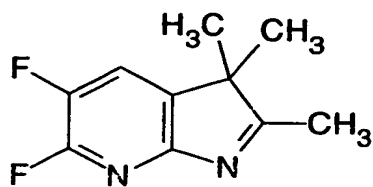
A I N-7



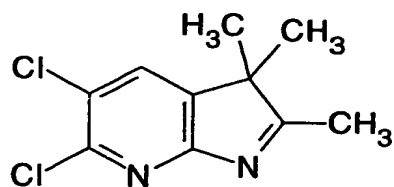
A I N-8



A I N-9



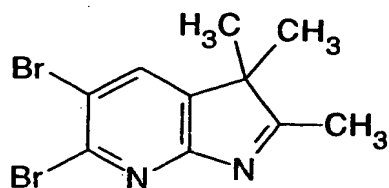
A I N-10



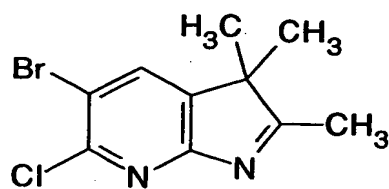
【0014】

【化 5】

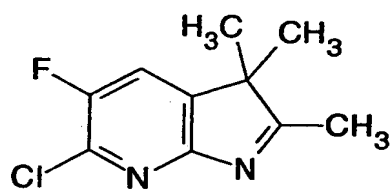
A I N-11



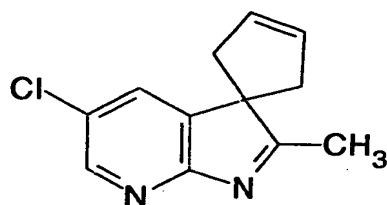
A I N-12



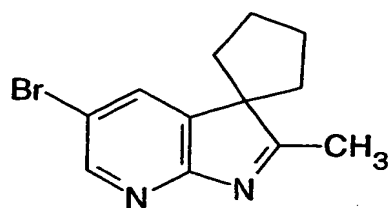
A I N-13



A I N-14



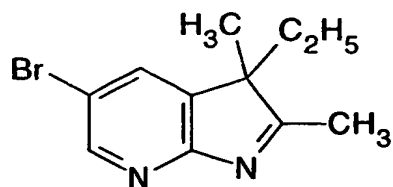
A I N-15



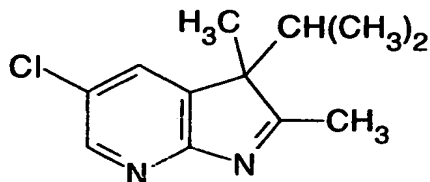
【0015】

【化 6】

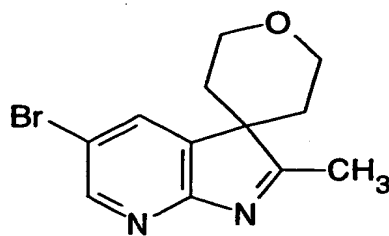
A I N-16



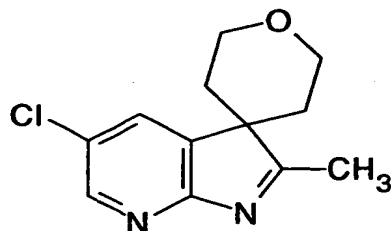
A I N-17



A I N-18



A I N-19



【0016】

上記式(I)で表わされる本発明の化合物は、酸付加塩として存在することができ、置換基の種類によっては塩基付加塩として存在する場合もある。塩としては、例えば、塩酸塩、硫酸塩、硝酸塩、リン酸塩などの鉱酸塩、メタンスルホン酸塩、p-トルエンスルホン酸塩、酒石酸塩、クエン酸、マレイン酸塩などの有機酸塩のほか、ナトリウム塩、カリウム塩、カルシウム塩などの金属塩、アンモニウム塩、トリエチルアミン塩などの有機アミン塩、グリシン塩などのアミノ酸塩などを挙げることができる。本発明の化合物は、遊離形態又は塩の形態のほか、それらの水和物又は溶媒和物として存在する場合があるが、これらの物質はいずれも

本発明の範囲に包含される。また、本発明の化合物は置換基の種類に応じて1以上の不斉炭素を有する場合があるが、光学異性体やジアステレオ異性体などの立体異性体、立体異性体の混合物、ラセミ体などはいずれも本発明の範囲に包含される。

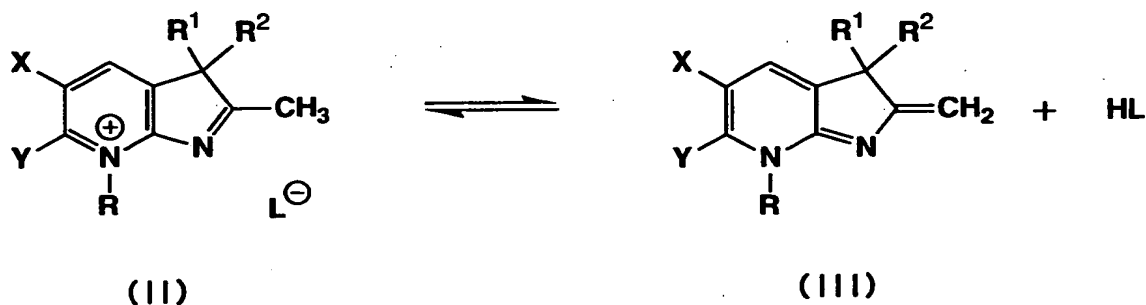
## 【0017】

一般式(I)で表される化合物は、例えば、フィッシャーのインドール合成として著名な反応を用いて合成可能である。この反応に関しては多くの成書に詳しく解説されているが、特に反応条件(温度、溶媒、時間、反応試剤など)についてはR. J. Sudberg著「The Chemistry of Indoles」(Academic Press, New York) 1970年およびそこで引用されている文献を参考にすることができる。本発明の化合物の製造では、通常のインドール又はインドレニン合成よりも高温で反応を行うことが好ましい場合がある。本発明の化合物の製造方法を本明細書の実施例に具体的に示したので、上記の文献及び実施例の具体的説明を参照しつつ、原料化合物、反応試薬、反応条件などを適宜選択することにより、一般式(I)に包含される化合物を容易に製造することが可能である。

## 【0018】

一般式(I)で表される本発明の化合物は、蛍光色素の製造用中間体として有用である。一般的には、本発明の化合物をアルキル化剤(R-L)を用いて一般式(II)で表される4級塩とした後に、種々の化合物と反応させて蛍光色素に導くことができる。一般式(II)で表される化合物は一般式(III)で表される化合物と平衡にあるため、種々の条件下で求電子剤と反応させて色素へと導くことができる。

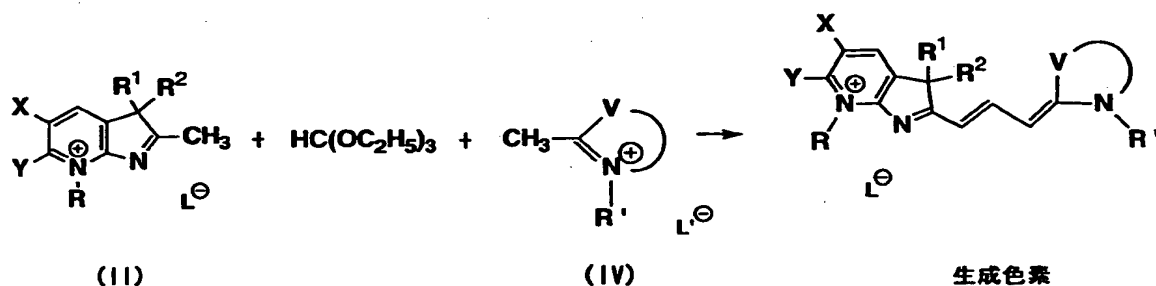
【化 7】



【0019】

蛍光強度の高い蛍光色素を得る方法の一例として、以下の工程に従ってシアニン色素へと導く方法を挙げることができる。

【化 8】



【0020】

高い蛍光強度を得るためには、一般式 (IV) で表される 4 級塩として一般式 (II) に包含される 4 級塩を用いることが好ましいが、一般式 (IV) で表される 4 級塩は、一般式 (II) で表される 4 級塩と同一でも異なってもよい。

【0021】

【実施例】

以下、本発明を実施例によりさらに具体的に説明するが、本発明の範囲は下記の実施例に限定されることはない。なお、実施例中の化合物番号は、上記に好ましい化合物として例示した化合物の番号に対応している。

例 1 : A I N - 2 の合成

2, 5 - ジクロロピリジン 1 5 0 グラム、エタノール 3 0 0 ミリリットル、包水ヒドラジン 3 0 0 ミリリットルを混合し、4 0 時間加熱還流した。エタノールを減圧下で留去し、水を加えて析出した結晶を濾取した。水洗、乾燥を行い、5 -

クロロ-2-ヒドラジノピリジン 113 グラムを得た。収率 77.7%。

【0022】

5-クロロ-2-ヒドラジノピリジン 35 グラム、3-メチル-2-ブタノン 100 ミリリットルを混合し、100℃で30分間反応した。3-メチル-2-ブタノンを留去したのち、1,4-ブタンジオール 100 ミリリットルを加え 240℃に加熱し、5時間還流した。反応液を冷却し、そのままシリカゲルカラムクロマトグラフィーにかけ、nmrで各フラクションを確認した。目的物を含むフラクションを集め、溶媒を留去したのちヘキサン/酢酸エチルから結晶化させた。収量 14.0 グラム、収率 29.5%。

AIN-2 : 融点 118-120℃

【0023】

例 2 : AIN-3 の合成

2,5-ジブロモピリジン 150 グラム、エタノール 300 ミリリットル、包水ヒドラジン 250 ミリリットルを混合し、50時間加熱還流した。エタノールを減圧下で留去し、水を加えて析出した結晶を濾取した。水洗、乾燥を行い、5-ブロモ-2-ヒドラジノピリジン 105 グラムを得た。収率 88.2%。

【0024】

5-ブロモ-2-ヒドラジノピリジン 10 グラム、3-メチル-2-ブタノン 20 ミリリットルを混合し、80℃で15分間反応した。3-メチル-2-ブタノンを留去したのち、1,4-ブタンジオール 15 ミリリットルを加え 230℃に加熱し、5時間反応した。反応液を冷却し、そのままシリカゲルカラムクロマトグラフィーに附し、nmrで各フラクションを確認した。目的物を含むフラクションを集め、溶媒を留去したのちヘキサン/酢酸エチルから結晶化させた。収量 2.0 グラム、収率 15.7%。

AIN-3 : 融点 132-134℃

【0025】

例 3 : AIN-5 の合成

2,6-ジフルオロピリジン 25 グラム、イソプロピルアルコール 100 ミリリットル、包水ヒドラジン 40 ミリリットルを混合し、3時間加熱還流した。イソ

プロピルアルコールを減圧下で留去し、水を加えて析出した結晶を濾取した。水洗、乾燥を行い、5-ブロモ-2-ヒドラジノピリジン 21.2 グラムを得た。収率 76.8%。乾燥中に着色が見られたため、乾燥後、速やかに次の反応に用いた。

## 【0026】

6-フルオロ-2-ヒドラジノピリジン 10 グラム、3-メチル-2-ブタノン 20 ミリリットルを混合し、80℃で15分間反応した。3-メチル-2-ブタノンを留去したのち、エチレングリコール 20 ミリリットルを加え 220℃に加熱し、5時間還流した。反応液を冷却し、水と酢酸エチルを加え、目的物を有機相に抽出した。酢酸エチルを留去しシリカゲルカラムクロマトグラフィーを用いて精製した。ヘキサン/酢酸エチルから結晶化させた。収量 3.2 グラム、収率 22.8%。

AIN-5：融点 88-90℃

## 【0027】

## 例 4：蛍光色素 1 の合成

AIN-2 (2 グラム) をアセトン 10 ミリリットルに溶解し、2 ミリリットルのヨウ化メチルを加え、少しずつ反応温度を上げて反応の進行を TLC で追跡した。原料がほぼ消失したことを確認して、反応液を減圧留去した。残さにエーテルを加えて攪拌し、上清を捨て、未反応物を除いた。ついで、溶媒として酢酸、ピリジンを加え、過剰量のオルトギ酸エチル、2 当量のトリエチルアミンを加えて 150℃に加熱した。反応の進行は TLC で追跡した。反応終了後（反応時間：約 1 時間）、酢酸エチルを加え、攪拌後、上清を除くことを繰り返すと、目的物のヨウ化物塩が粗結晶として得られた。

## 【0028】

セファデックス（ファルマシア製）を用いて数回生成した後、過塩素酸テトラブチルアンモニウムを加えて塩交換し、過塩素酸塩として目的物を得た。吸収極大波長 621 nm、分子吸光係数 12.5 万。

## 【0029】

得られた蛍光色素 1 を Cy 5（アマシャム社製）と蛍光強度の比較を行った。こ

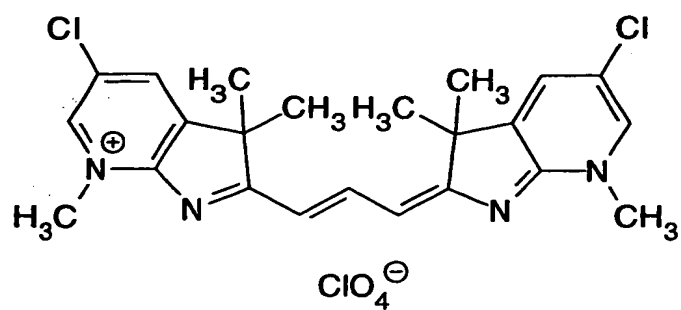
の結果を以下に示す（測定条件：いずれもメタノール溶媒、吸光度を 0.4 とした時の比較）。本発明の化合物から誘導される蛍光色素は、従来の蛍光色素と比較して蛍光励起スペクトルの極大波長も異なり、さらに蛍光強度が 4 倍も高いことが示され、本発明の化合物の有用性が示された。

色素	蛍光励起スペクトル極大	蛍光強度（相対比）
Cy 5	647 nm	1
蛍光色素 1	623 nm	4

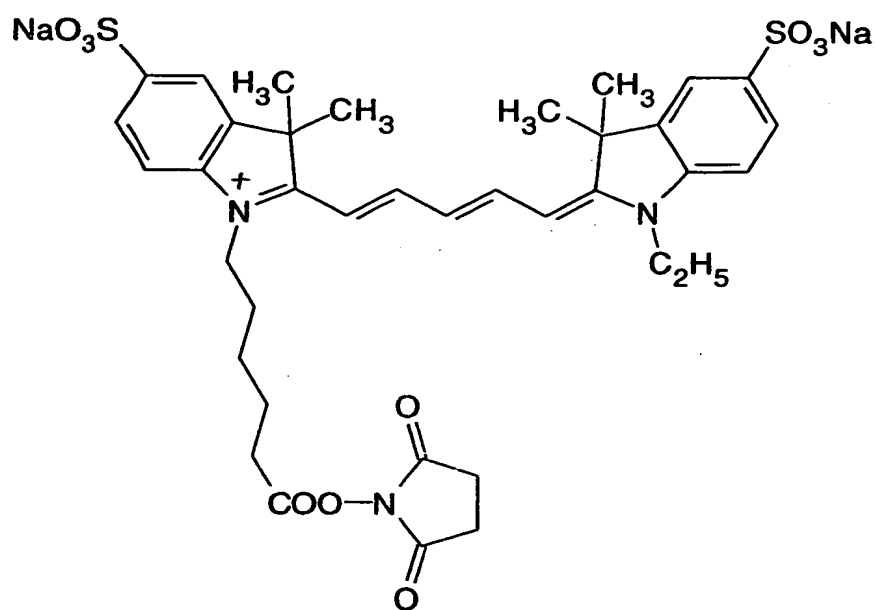
【0030】

【化 9】

蛍光色素 1



Cy 5



【0031】

【発明の効果】

本発明の化合物は蛍光色素の製造用中間体として有用であり、特に、従来の蛍光色素に比較して蛍光励起スペクトルの極大波長が異なり、蛍光強度が高い蛍光色

特平 1 1 - 2 6 4 8 4

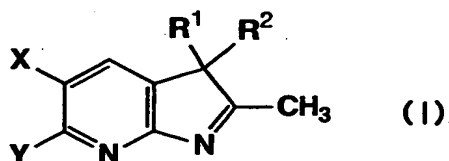
素の製造に有用である。

【書類名】 要約書

【要約】

【解決手段】 一般式（X及びYはそれぞれ独立に水素原子又はハロゲン原子を示すが、いずれか一方はハロゲン原子を示し； $R^1$ 及び $R^2$ はそれぞれ独立に置換又は無置換のアルキル基を示すか、あるいは $R^1$ 及び $R^2$ が互いに結合してそれらが置換する炭素原子とともに3～7員環の非芳香族炭素環又は非芳香族ヘテロ環を形成してもよい）で表される3H-ピロロ[2, 3-b]ピリジン化合物又はその塩。

【化1】



【効果】 蛍光色素の製造用中間体として有用であり、特に、従来の蛍光色素と比較して蛍光励起スペクトルの極大波長が異なり、蛍光強度が高い蛍光色素の製造に有用である。

出 願 人 履 歴 情 報

識別番号 [000005201]

1. 変更年月日	1990年 8月14日
[変更理由]	新規登録
住 所	神奈川県南足柄市中沼210番地
氏 名	富士写真フイルム株式会社